

**Eine einfache Methode zur
Isolierung von Heparin aus dem
Serum als Grundlage einer
quantitativen Bestimmung**

Christiane Burger

1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Eine einfache Methode zur
Isolierung von Heparin aus dem
Serum als Grundlage einer
quantitativen Bestimmung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christiane Burger
aus Marburg/Lahn

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. N. ZÖLLNER
Mitberichterstatter:	Professor Dr. M. KIESE
	Professor Dr. H. REICHEL
Dekan:	Professor Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung 9.1.1962



INHALTSVERZEICHNIS

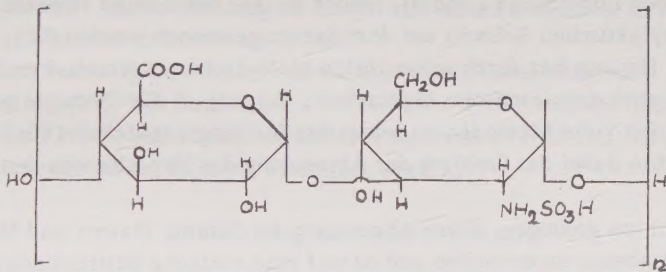
	Seite
I. Einleitung	5
II. Frühere Methoden zur Abtrennung des Heparins vom Eiweiß	6
1. Die Phenolextraktion	7
2. Die Fällung mit Octylamin	7
3. Die Fällung mit Benzofuran	7
III. Grundlagen der Methode zur quantitativen Heparinbestimmung	7
1. Die Metachromasie	8
2. Die Carbazolreaktion	8
3. Die Ribonucleasehemmung	9
4. Die Antithrombinmethode	9
IV. Die technische Durchführung der Methoden	9
1. Die metachromatische Methode	9
a) Reagenzien	9
b) Die Herstellung der Eichkurve	10
c) Die Messung der unbekannten Heparinmenge	10
2. Die Carbazolmethode	11
a) Reagenzien	11
b) Die Herstellung der Eichkurve	11
c) Die Messung der unbekannten Heparinmenge	11
V. Die Heparinisolierung	12
1. Fällungsmittel	12
2. Der Puffer	13
3. Vorversuche zur Heparinisolierung	13
a) Der Weg zur Dialyse des Heparins	13
b) Die Durchführung der Heparindialyse	14
c) Die Abtrennung der Proteine durch Phenol	14
d) Der Einsatz von Heparin in die einzelnen Versuchsschritte	16
e) Hochtouriges Zentrifugieren	17
4. Eingehende Beschreibung und Ergebnisse der Heparinisolierung	18
a) mit dialysiertem Heparin	18
b) mit Liquemin	19

VI.	Vorversuche zur Anwendung der Methode	21
1.	Heparin im Citratblut	21
2.	Die Bestimmung des Heparinblutspiegels nach Injektion von Liquemin	21
VII.	Diskussion	23
1.	Das Verhalten des Heparins im Blut	23
2.	Endogenes Heparin	23
3.	Der Heparinspiegel im Blut und Urin nach Heparininjektion	24
4.	Vorschlag zur besseren Fällung von Liquemin in höherer Konzentration	25
VIII.	Zusammenfassung	25
IX.	Abbildungen	26
X.	Schrifttum	29

I. EINLEITUNG

Im Jahre 1916 entdeckte McLean (1) das Heparin. Die große Zahl der biologischen Eigenschaften (1-7) brachten dem Heparin seine heutige Bedeutung in der Therapie. Damit wuchs das Bedürfnis nach einer allgemeinen brauchbaren Bestimmungsmethode. Die Aufklärung seiner chemischen Natur war hierzu eine wesentliche Voraussetzung.

Die Aufklärung der chemischen Natur des Heparins begann schon vor 1924 durch Howell (1), der das Heparin als Phosphatid, später als N-freien Uronsäurekomplex ansah. Erst 1935 brachten die Arbeiten von Jorpes (1) die grundlegende Erkenntnis, daß das Heparin in die Reihe der Mucopolysaccharide gehört, aus Uronsäure und Glucosamin aufgebaut und durch einen hohen Gehalt an Schwefelsäure ausgezeichnet ist. Im Jahre 1946 konnte Wolfrom (2) nachweisen, daß die im Heparin enthaltene Uronsäure Glucuronsäure ist. So kam man zu der heute allgemein anerkannten Formel (5):



zusätzlich ist in O-2 OH-Gruppen H durch SO_3H ersetzt.

Nach Untersuchungen von Snellmann (8), der für Heparin ein Molekulargewicht von 16 000 ermittelte, ist für $n = 26$ zu setzen. Nach Kofler und Vogler (9) beträgt das Molekulargewicht des gereinigten Heparins aus Rinderlunge mit 130 IE/mg ungefähr 12 000 und $n = 20$. Nach amerikanischen Wissenschaftlern (10) beträgt es 24 000 bei 300 IE/mg.

Heparin unterscheidet sich von den anderen Mucopolysacchariden dadurch, daß die Aminogruppe seines Glucosamins mit einer Sulfatgruppe besetzt ist. Abgesehen davon ist die Position der $-\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen noch stark umstritten (5). Fraglich ist, ob Heparin überhaupt hinsichtlich des Sulfatierungsgrades wie auch des Polymerisationsgrades ein einheitlicher Stoff ist. Jaques definierte deshalb das Heparin als natürlich vorkommendes, sulfatiertes Mucopolysaccharid mit anticoagulatorischen und metachromatischen Eigenschaften (12). Außerdem gibt es noch eine Reihe heparinähnlicher Stoffe mit anticoagulatorischen Eigenschaften (z.B. β -Heparin, Hyaluronschwefelsäure, höher sulfatierte Chondroitinschwefelsäure (2).

Im Organismus kann aus praktisch allen parenchymatösen Organen Heparin extrahiert werden. Als Bildungs- oder Speicherungsart wird die Granula der basophilen Mastzellen (Ehrlich) angesehen (5). So isolierte Korn Heparin aus Mastzelltumoren der Maus (33).

Die Wirkungen des Heparins im Organismus sind noch nicht alle geklärt. Als Anticoagulans hemmt Heparin in Gegenwart gewisser Plasmaproteine als Co-faktoren sowohl die Bildung vom Thrombin, als auch die fermentative Wirkung des Thrombins auf Fibrinogen. Weiterhin soll Heparin schon die Vorphase der Blutgerinnung über die Blutplättchen bzw. aus ihnen entstehende Faktoren hemmen. Nach Injektion von Heparin wurde im Blut eine Lipämieklärung beobachtet. Im Tierversuch treten Atheromatosen nach Cholesterinfütterung angeblich nicht auf, wenn gleichzeitig Heparin gegeben wird. Bei Patienten mit Atheromatose soll die Zufuhr von Heparin zu anhaltenden Blutdrucksenkungen bei Hypertonie führen (6). Außerdem hemmt Heparin die Wirkung vieler Fermente (z.B. Ribonuclease), beeinflusst die Wundheilung und hemmt das Wachstum bzw. die Zellteilung von Gewebekulturen. Inwieweit Heparin bei der Verhütung allergischer Reaktionen mitwirkt, ist noch umstritten (1 und 5), jedoch konnte beim Hund Heparin während eines anaphylaktischen Schocks aus dem Serum gewonnen werden (21).

Das Heparin hat durch seine vielen biologischen Eigenschaften, besonders durch seine anticoagulatorische Eigenschaft, Eingang in die Therapie gefunden. Danach wurden viele Methoden zu seiner Bestimmung entwickelt (13-23). Fast immer tauchte dabei das Problem der Abtrennung des Heparins von den Proteinen auf.

Es ist uns gelungen, diese Abtrennung im Serum, Plasma und Vollblut mit sehr guter Ausbeute zu erreichen und darauf eine einfache Bestimmungsmethode aufzubauen.

II. FRÜHERE METHODEN ZUR ABTRENNUNG DES HEPARINS VOM EIWEISS

Aus der großen Zahl der einschlägigen Arbeiten auf diesem Gebiet seien hier nur drei genannt: Die Arbeiten von Homan und Lens 1948 (13), Jaques, Monkhouse und Stewart 1949 (14) und 1950 (15) und von Marbet und Winterstein (16).

1. DIE PHENOLEXTRAKTION

Homan und Lens (13) beschrieben 1948 eine Methode, nach der die Serumproteine vom Heparin durch Phenol getrennt werden können: Aus 400 ml der Heparin enthaltenden Lösung werden durch Zugabe von 200 ml einer 80 %igen Phenollösung die Proteine gefällt und im Phenol gelöst; hierbei geht das Heparin in die proteinfreie, klare, wässrige Phase über dem Phenol. Homan und Lens verwendeten diese Methode zur Extraktion des Heparins aus Rinderlunge. Zur Gewinnung kleinerer Heparinmengen wurde diese Phenolextraktion später von Monkhouse und Jaques übernommen (15).

2. DIE FÄLLUNG MIT OCTYLAMIN

Jaques, Monkhouse und Stewart (14) verwendeten die salzbildende Eigenschaft des Heparins zu seiner Fällung aus Serum: n - Octylamin - hydrochlorid fällt bei geeigneter Konzentration das Heparin mit sehr wenig Eiweiß direkt aus dem Serum aus. Aus der Bindung an Octylamin wird das Heparin durch Alkali freigesetzt und erneut mit Brucin gefällt.

Später wurde diese Methode durch eine Phenolextraktion nach Homan und Lens erweitert (15): Bei Heparinzugaben zwischen 0,362 mg und 0,022 mg zum Plasma von 9 ml Citratblut konnte dadurch der konstante Verlust von 31 % auf 20 % des zugegebenen Heparins verringert werden.

3. FÄLLUNG MIT BENZOFURAN

Marbet und Winterstein (16) verwendeten als Fällungsmittel Dimethyl-amino-methyl-dibenzofuran, welches nach diesen Autoren für Heparin sehr spezifisch ist und die sehr ähnlichen Chondroitinschwefelsäuren nicht mitfällt. Das schwer lösliche Salz bleibt im Urin kolloid gelöst und kann nephelometrisch bestimmt werden. Diese Methode arbeitet mit einer Genauigkeit von 10 % bei Heparinkonzentrationen bis zu einer unteren Grenze von 2 mg/100 ml.

III. DIE GRUNDLAGEN DER METHODE ZUR QUANTITATIVEN HEPARINBESTIMMUNG

Nach Abtrennung des Heparins von den Proteinen können verschiedene Methoden zu seiner Bestimmung angewandt werden.

Bei unseren Versuchen haben wir mit der metachromatischen Bestimmungsmethode nach McIntosh (20) und mit der Reaktion mit Carbazol, die von Dische beschrieben worden ist, (24), gearbeitet. Beide Bestimmungsmethoden sind rela-

tiv einfach und schnell durchzuführen.

Eine genauere und vermutlich auch spezifischere Bestimmung sehr kleiner Heparinmengen kann mit Hilfe der Ribonucleasehemmung nach Zöllner und Fellig (25) und Hobom (26) oder mit der Antithrombinmethode nach Jaques und Charles (21) durchgeführt werden.

1. DIE METACHROMASIE

Als Metachromasie bezeichnet man die Erscheinung der Farbänderung gewisser basischer Farbstoffe (22) bei der Adsorption an bestimmte anionische Polymere. Allen Farbstoffen, die diese Eigenschaft zeigen, ist eine freie Aminogruppe gemeinsam (22 und 27). Ausdruck der Metachromasie ist eine Veränderung des Spektrums, d. h. die Wellenlänge des Adsorptionsmaximums des Farbstoffes verändert sich.

Die metachromatische Wirksamkeit des Heparins ist durch die vielen sauren Gruppen bedingt. Die Metachromasie ist also keine spezifische Wirkung des Heparins (28).

Im Jahre 1941 entwickelte McIntosh (20) eine metachromatische Methode zur Standardisierung von Heparinpräparaten mit Toluidinblau. Er stellte fest, daß die Abnahme der Farbintensität des Toluidinblaus proportional der steigenden Heparinkonzentration ist, bis etwa 90 % des Toluidinblaus farblich verändert sind. Von da ab ist keine Proportionalität mehr festzustellen; zur vollständigen farblichen Veränderung des Toluidinblaus ist sehr viel Heparin nötig.

Jaques, Mitford und Rickert (22) verbesserten diese Methode. Da die Metachromasie des Toluidinblaus gegen Änderungen der Temperatur, des pHs und der Ionenstärke (besonders bi- und trivalenter Kationen) sehr empfindlich ist (20), gingen sie zu dem weniger empfindlichen Azur A über, einem asymmetrischen Dimethylthionin. Azur A hat ein Absorptionsmaximum bei 620 m μ . Dieses Maximum wird bei Heparinzugabe verringert und es erscheint ein schwächeres metachromatisches Maximum bei 530 m μ (nach eigenen Beobachtungen bei 515 m μ).

2. DIE CARBAZOLREAKTION

Im Jahre 1955 beschrieb Dische (24) eine zur Bestimmung von Polysacchariden geeignete Farbreaktion; diese beruht darauf, daß Bruchstücke, die aus Polysacchariden beim Kochen mit 87 %iger Schwefelsäure entstehen, mit Carbazol, einem tricyclischen Stoff aus einem Pyrrol- und zwei kondensierten Benzolringen, instabile farbige Verbindungen eingehen. Die dabei ablaufende Reaktion wurde von Dische nicht definiert. Sie ist für Heparin unspezifisch, aber einfach und gut geeignet zum quantitativen Nachweis sehr geringer Mengen.

3. DIE RIBONUCLEASEHEMMUNG

Heparin hemmt bereits in sehr niedriger Konzentration die Spaltung der Ribonucleinsäure durch Ribonuclease (25); aber auch die Spaltung cyclischer Pyrimidinnucleotide wird gehemmt (26). Beide Hemmungen konnten zur Grundlage quantitativer Bestimmungsmethoden gemacht werden (Lorenz, Lorenz und Zöllner (29), Hobom (26). Die Heparinbestimmung mit Hilfe der Hemmung cyclischer Nucleotide ist die empfindlichste und erlaubt den Nachweis von 0,2 - 0,25 γ Heparin.

4. DIE ANTITHROMBINMETHODE

Charles und Jaques (21) gingen von der hemmenden Wirkung des Heparins auf die Blutgerinnung aus. Mit ihrer Antithrombinmethode können Konzentrationen bis hinunter zu 0,36 γ /ml gemessen werden.

IV. DIE TECHNISCHE DURCHFÜHRUNG DER METHODEN

Die in dieser Arbeit angewandte metachromatische Bestimmung lehnt sich an die Arbeit von Jaques und Mitarbeiter (22) an; es wurden jedoch einige Änderungen eingeführt (siehe unten).

Die Carbazolmethode wurde in der vorliegenden Arbeit nach der Beschreibung von Dische (24) durchgeführt, wobei aber zusätzliche Kontrollbestimmungen nötig waren.

Die Durchführung der Bestimmungen mit der Ribonucleasehemmungsmethode verdanken wir Herrn Hobom.

Antithrombinteste wurden nicht durchgeführt.

1. DIE METACHROMATISCHE METHODE

a) Reagenzien:

Azur A (Dr. Theodor Schuchardt G.m.b.H. und Co, München)

20 mg in 100 ml Wasser;

0,15 m Kaliumphosphat-Puffer ph 7,3;

0,2 n Natronlauge;

Heparinstandardlösung: Eine Lösung von 4 mg/ml

Heparin (Biochemicum La Roche) mit 113 IE/mg wird dialysiert (Durchführung siehe unten). Nach dem Dialysieren konnte durch die Carbazolreaktion noch 1 mg/ml nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein Anstieg der Aktivität auf 125 IE/mg, gemessen mit der Ribonucleasehemmung.

Liqueminstandardlösung: Etwa 0,25 mg/ml; aus der handelsüblichen Lösung "Hoffmann-La Roche" (5000 IE/ml) wird 1 ml auf 25 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt (es wurde dabei eine Aktivität von 130 IE/mg angenommen.)

b) Die Herstellung der Eichkurve:

Zu verschiedenen Heparinmengen der Standardlösung, 40 γ ; 20 γ ; 10 γ ; 5 γ ; 2,5 γ und einem Leerwert werden zwei Tropfen Natronlauge gegeben; dann wird auf 2 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Je 1 ml wird in eine Cuvette einpipettiert. In die Cuvette werden 1 ml Puffer, 0,1 ml destilliertes Wasser und 0,4 ml der Azurlösung hinzugegeben. Das Gemisch wird in der Cuvette vorsichtig mit einem Glasstab umgerührt. In eine weitere Cuvette wird statt der Heparinlösung 1 ml destilliertes Wasser als Vergleichswert gegeben.

Abgelesen wird am Spektralphotometer "M 4 Q" von Zeiss, bei einer Wellenlänge von 515 m μ .

Zunächst wird der Vergleichswert gegen Wasser gemessen. Er soll in der 1 cm Cuvette eine Extinktion von etwa 0,400 haben. Der Vergleichswert wird auf 0 eingestellt und die Cuvette mit der Heparinlösung gegen ihn abgelesen. Dadurch wird erreicht, daß die Extinktionen im optimalen Ablesungsbereich des Spektralphotometers liegen.

Die in eine Kurve eingetragenen Extinktionswerte der Heparinlösung ergeben eine Gerade (Abbildung 1). Bei höheren Heparinkonzentrationen (etwa 120 γ in der Cuvette) flacht sich die Kurve langsam ab, eine Beobachtung, die McIntosh schon für Toluidinblau gemacht hat (20).

c) Die Messung der unbekannten Heparinmenge

Die bereits alkalisierte Lösung des isolierten Heparins (siehe unten) wird auf 2 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Je 1 ml wird in eine Cuvette einpipettiert und die Messung genau so durchgeführt wie bei der Herstellung der Eichkurve.

Es fiel auf, daß der Serumleerwert, d. h. die Extinktion, die man bei Aufarbeitung von Serum ohne Heparinzusatz erhält, nicht mit dem Leerwert der Eichkurve zusammenfiel. Auch zeigten sich für verschiedene Seren unterschiedliche Extinktionen der Leerwerte. Ein Teil dieser Schwankungen beruht vermutlich auf der Empfindlichkeit der Metachromasie gegen pH-Verschiebung, hier bedingt durch den Puffer, der bei der Trennung des Heparins vom Protein zugegeben wurde, sowie durch die unterschiedliche Eigenpufferung der Seren.

Ob der Unterschied zum Teil auf endogenes Serumheparin zurückzuführen ist, muß offengelassen werden. Durch die Ribonucleasehemmungsmethode konnte kein Serumheparin nachgewiesen werden. Nach Arbeiten von Engelberg, Dudley und Freemann (30) soll das im Blut zirkulierende Heparin so fest an Serumprotein gebunden sein, daß es nur durch die Einwirkung eines proteolytischen Fermentes, am besten des Trypsins, zu gewinnen ist. Mengenangaben machten Engelberg und Mitar-

beiter nicht, doch halten sie das natürliche Vorhandensein von Heparin im Blut für gesichert.

Vielleicht muß bei den auftretenden Schwankungen der Serumleerwerte noch an Spuren von Proteinen gedacht werden, die durch schwache Trübung die Extinktionen erhöhen.

Die Schwankungen des Serumleerwertes machen es notwendig, daß bei jeder Bestimmung von aus Serum isoliertem Heparin ein Serumleerwert mitbestimmt werden muß. Durch den Punkt der Leerwertextinktion wird eine Parallele zur Eichkurve gezogen. Die Werte für die isolierten Heparinmengen müssen auf der Parallele abgelesen werden.

2. DIE CARBAZOLMETHODE

a) Reagenzien:

87 %ige Schwefelsäure;

0,1 % Carbazol in Alkohol;

Absoluter Alkohol;

Heparinstandardlösung: siehe unter metachromatischer Methode.

b) Die Herstellung der Eichkurve:

Je drei Reagenzgläser mit verschiedenen Heparinmengen der Standardlösung, 100 γ ; 50 γ ; 25 γ und 3 Leerwertgläser werden auf 1 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Im Eiswasserbad werden langsam in jedes Reagenzglas 6 ml der Schwefelsäure einpipettiert. Die Gläser werden genau 20 Minuten im Wasserbad gekocht und in Leitungswasser abgekühlt. In je 2 gleiche Gläser werden 0,2 ml der Carbazollösung, in das dritte 0,2 ml Alkohol gegeben. Mit einem Glasstab wird gut umgerührt. Nach etwa 2 Stunden hat sich eine rote Farbe entwickelt, die nach einer weiteren Stunde langsam wieder verblaßt.

Genau nach 2 Stunden wird im Zeiss-Spektralphotometer "M 4 Q" bei einer Wellenlänge von 530 m μ gegen Wasser abgelesen. Der Carbazolleerwert gibt eine Extinktion von 0,030, das entspricht etwa 15 γ Heparin.

Nun wird der Alkoholleerwert, der allerdings meist 0 beträgt, jeweils von den Carbazolwerten abgezogen. Die Differenz der Extinktionswerte der Heparinlösung geben eine Gerade (Abbildung 4), die nach Abzug des Carbazolleerwertes durch 0 geht.

Ein Versuch mit steigenden Carbazolmengen ergab, daß 0,2 ml der Carbazollösung für 100 γ Heparin ausreichen.

c) Die Messung der unbekannten Heparinmenge

In einem Dreifachversuch wird das isolierte Heparin mit Wasser auf je 1 ml aufgefüllt. Die Messung erfolgt wie bei der Herstellung der Eichkurve. Nach Abzug

des Alkoholleerwertes vom Carbazolwert ergibt sich die Heparinmenge aus der Kurve.

V. DIE HEPARINISOLIERUNG

Die folgenden Ausführungen befassen sich mit der Beschreibung unserer Versuche, durch welche die Abtrennung des Heparins von den Proteinen mit Hilfe eines Fällungsmittels erreicht wurde. Heparin läßt sich leicht als Salz fällen, da es außer einer Sulfamatgruppe noch bis zu 2 Sulfatgruppen pro Disaccharid besitzt, die bei neutralen pH-Werten als Anionen vorliegen.

1. DAS FÄLLUNGSMITTEL

Bei der Suche nach einem spezifischen Fällungsmittel für Heparin wurden verschiedene Chinolinderivate und Acridine ausgetestet. Die Chinoline zeigten sich fast alle als sehr empfindlich gegen Salzkonzentrationen und fielen zum Teil schon bei einer Molarität von 0,3 aus, mit Ausnahme von Surfen (N-N², Di-(2-methyl-4-amino-chinolyl-6-).carbamid-hydrochlorid), welches erst bei einer Salzkonzentration von mehr als 1 m ausfiel, jedoch verhältnismäßig viel Eiweiß mitfällte. Besser eigneten sich die Acridine als Fällungsmittel, da diese nur Spuren von Eiweiß mitfällten.

Durch ihre gute Löslichkeit und geringe Eiweißmitfällung zeigten sich folgende Acridinamine als besonders geeignet:

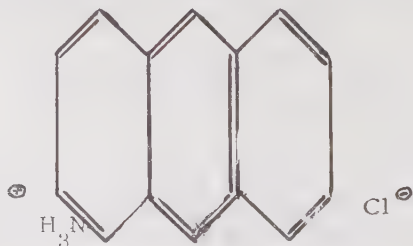
A: 5 - Amino-acridin-hydrochlorid;

B: 3 - Chlor-9-(p-guanidino-phenyl)-amino-acridindihydrochlorid;

C: 9 - Amino-acridin-hydrochlorid

Die meisten der im folgenden beschriebenen Versuche wurden mit Fällungsmittel A (FA) gemacht. FA ließ sich bei schwachem Erwärmen leicht in Lösung bringen, fällte wenig Eiweiß mit, zeigte sowohl bei der Metachromasie als auch bei der Carbazolreaktion keine störende Extinktionsnebenwirkung und ließ sich mit Natronlauge aus seiner Verbindung mit Heparin in Äther treiben.

Formel:



Für 200 γ Heparin in 2 ml Acetatpuffer reichten 0,2 ml 0,4 %iges FA aus; bei Zugabe von 1 ml Serum wurden jedoch 0,4 ml der Fällungsmittellösung benötigt, damit nach dem Zentrifugieren im Überstand kein Heparin mehr gefällt werden konnte. Erst bei weiterer Steigerung der Fällungsmittelmenge auf 1 ml konnte nach einem freien Intervall ein neuer Niederschlag beobachtet werden. Dieser Niederschlag beruhte wahrscheinlich darauf, daß bei höherer Fällungsmittelkonzentration sehr viel Serumeiweiß mitgefällt wurde.

Um bei unseren Versuchen sicher zu gehen, daß alles Heparin gefällt und möglichst wenig Eiweiß mitgefällt wird, verwendeten wir zur Fällung von 200 γ oder kleineren Mengen Heparin 0,6 ml einer 0,4 %igen FA-Lösung; die Fällungsmittelmenge entsprach etwa der Mitte des freien Intervalls.

2. DER PUFFER

Da Fällungsmittel A bei einer Salzkonzentration von etwa 0,2 m ausfiel, mußte ein verdünnter Puffer genommen werden. Wir benutzten in unseren Versuchen 0,05 m Acetatpuffer.

Heparin ist bei pH 7 kochbeständig und mit schwachen Alkali bei 60 Grad verhältnismäßig stabil. Mit stärkeren Alkali oder Säuren verliert es seine Stabilität (8). Besonders die Sulfamatgruppe ist säurelabil. Die Reaktion sollte daher möglichst im neutralen Bereich stattfinden und der Puffer nur kurzfristig mit dem Heparin in Berührung gebracht werden. Nach unseren Beobachtungen fiel am wenigsten Serumeiweiß im Bereich von pH 5,8 aus. Wurde Heparin zugegeben, so konnte in einem Bereich von weniger als pH 5,4 eine stärkere Eiweißfällung beobachtet werden, die durch Acridinamin eine Wiederauflösung erfuhr (5 u. 32). Wir benutzten bei unseren Versuchen einen Acetatpuffer von pH 5,9.

3. VORVERSUCHE ZUR HEPARINISOLIERUNG

Wie oben schon erwähnt wurde, benutzten wir zur Bestimmung der Heparinmenge gleichzeitig die Metachromasie und die Carbazolreaktion. Beide Methoden stimmten mit ihren Ergebnissen weitgehend überein. Die Metachromasie zeigte sich jedoch für kleine Heparinmengen als viel empfindlicher. Mit ihr konnten in der 1 cm Cuvette noch gut Mengen von 1 γ Heparin quantitativ nachgewiesen werden.

a) Der Weg zur Dialyse des Heparins

In drei Reagenzgläser wurden gleiche Heparinmengen gegeben. Das erste Glas wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt und direkt bestimmt. In das 2. und 3. Glas kamen je 2 ml Puffer, 0,6 ml FA Lösung und in das 3. Glas außerdem noch 1 ml Serum. Die beiden Gläser wurden dann 20 Minuten bei 3000 U/min

zentrifugiert, vorsichtig bis auf etwa 0,3 ml abgesaugt, und auf 1 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Carbazolreaktion ergab:

Glas:	1	2	3
Heparin (50 γ)	= 100 %	= 88 %	= 65 %

Durch die Anwendung verschiedener Kochsalzkonzentrationen konnte das Ergebnis im Gegensatz zu den Ergebnissen von Korn (33) nicht verbessert werden.

Im 2. Glas, in dem kein Serum enthalten war, fiel der Verlust von 10 % des Heparins auf. Es wurde vermutet, daß niedermolekulare Bruchstücke des Heparins vom Acridinamin deshalb nicht mitgefällt werden konnten, weil die Löslichkeit des Salzes wahrscheinlich zum Teil von seiner Teilchengröße, also von dem Polymerisationsgrad des Heparins abhängt. Um niedermolekulare Bruchstücke auszuschalten, dialysierten wir das Heparin. Wieweit allerdings die Aktivität des Heparins vom Sulfatgehalt und dem Polymerisationsgrad abhängt, ist noch nicht geklärt (2, 34 und 35).

b) Die Durchführung der Heparindialyse.

Ein Cellophanschlauch (Kalle u. Co, Wiesbaden-Biebrich) wurde 48 Stunden lang in einem auf eine Temperatur von 85 Grad eingestellten Brutschrank gelegt. Dadurch sollte eine Porenverengung des Schlauches bewirkt werden (33). Das verwendete Heparin (Biochemicum La Roche) (113 I. E. /mg) wurde eine Woche lang in diesem Schlauch gegen destilliertes Wasser, welches ständig erneuert wurde, dialysiert.

Mit dem dialysierten Heparin konnten nun bessere Ergebnisse erzielt werden. Die Carbazolreaktion ergab:

Glas:	1	2	3
Heparin (50 γ)	= 100 %	= 100 %	= 75 %
	= 100 %	= 97 %	= 73 %

Die Metachromasie ergab mit kleineren Heparinmengen:

Heparin (10 γ)	= 100 %	= 97 %	= 70 %
----------------	---------	--------	--------

c) Die Abtrennung der Proteine durch Phenol

Bei der Heparinfällung in Gegenwart von Serum (Glas 3) konnten immer nur etwa 75 % des zugegebenen Heparins wiedergefunden werden. Durch das Fällungsmittel allein konnte das Heparin vom Protein nicht vollständig abgetrennt werden. Durch Wärme oder Natronlauge wurde zwar das Protein denaturiert, aber gleichzeitig das Heparin zerstört. Wir versuchten daher, das Protein vom Heparin mit Phenol zu trennen.

Die Fällung mit Acridinamin und die nachfolgende Entfernung der Proteine durch Phenol brachten sehr schlechte Ergebnisse. Der getrocknete Heparin-Acridin-

niederschlag, der mit Phenol ohne wässrige Phase behandelt und zentrifugiert wurde, ergab nur 10 % der Ausgangsheparinmenge wieder, während beim Ausschütteln mit Phenol und wässriger Phase 50 % des Heparins wiedergefunden werden konnten. Das Acridinamin löste sich im Phenol und nahm dabei große Heparinmengen mit.

Die besten Ergebnisse brachten diejenigen Versuche, bei denen das Serum mit Heparinzusatz direkt mit Phenol behandelt und danach das Heparin mit Acridinamin gefällt wurde. Bei einer Gesamtlösungsmenge von etwa 6 ml erwiesen sich Phenolmengen von 2 ml als geeignet.

Die besten Ergebnisse konnten mit einem Puffer von pH 5 erzielt werden. Zwei ml des Puffers mit 1 ml Serum ergaben etwa einen pH von 6. Die Proteine zeigten im Bereich ihres I. P. die größte Neigung, ins Phenol zu gehen (I. P. der Albumine pH 4,9, Globuline pH 5,2 bis 6,1 (31)). Die Ergebnisse, die bei einem Puffer von pH 5,4 erreicht wurden, lagen um 5-10 % höher als diejenigen, die mit einem Puffer von pH 4,8 und pH 7,4 erzielt wurden. Die Molarität des Puffers betrug 0,5 m. (Nach Angaben von Schramm wurden bei der Darstellung der RNS auf analogem Wege mit niedrig konzentrierten Puffern die besten Ergebnisse erzielt (36).

Die Beschreibung der Versuchsanordnung zur Abtrennung der Proteine mit Phenol

Ein ml Serum, 2 ml 0,05 m Acetatpuffer von pH 5,4 und 0,2 ml einer bestimmten, dialysierten Heparinlösung (s. o. Seite 9) wurden mit 2 ml einer 92,5 %igen Phenollösung 5 Minuten lang kräftig geschüttelt und 8 Minuten bei 4500 U/min zentrifugiert. Ließ man das Reagenzglas nach dem Zentrifugieren für ein paar Minuten stehen, so klärten sich die beiden Phasen in eine gelbliche Phenol- und eine leicht trübe, wässrige Oberschicht mit einer etwa 2 mm breiten milchigtrüben Zwischenschicht auf. Die wässrige Phase, die den größten Teil des Heparins enthielt, wurde vorsichtig abgesaugt und noch 2 mal zusammen mit 0,5 ml der Phenollösung genau wie oben ausgeschüttelt, um dadurch letzte Spuren von Protein zu entfernen. Nach dreimaligem Ausschütteln war die dritte Phenolphase klar und die Zwischenschicht verschwunden. Die 3 Phenolphasen wurden zusammengegeben und ebenfalls dreimal mit je 2 ml Puffer ausgeschüttelt. Dies sollte bezwecken, möglicherweise noch in der Zwischenschicht oder im Phenol zurückgebliebenes Heparin zu gewinnen. Bei der gesonderten Kontrolle der einzelnen Phenolphasen konnten beim Auswaschen noch folgende Heparinmengen wiedergefunden werden:

wässrige Phase nach dem 1. Zentrifugieren:	60 %
" " " " 1. Nachspülen :	20 %
" " " " 2. " :	4 %
" " " " 3. " :	1 %
" " " " 4. " :	< 0,5 %

Daraus geht hervor, daß dreimaliges Nachspülen erforderlich und ausreichend war.

Das in der wässrigen Phase gelöste Phenol wurde durch dreimaliges Ausäthern entfernt. Leichte Trübung und Schaumbildung der Lösung deuteten darauf hin, daß immer noch Spuren von Proteinen vorhanden waren. (Zur Kontrolle wurde eine einfache Biuretprobe auf Eiweiß vorgenommen, die positiv ausfiel: 1 ml der Lösung wurde mit einem Tropfen 0,5 %igem CuSO_4 mit festem KOH übersättigt. Bei der Zugabe von wenigen Tropfen Alkohol färbte sich die Grenzschicht blau-violett. Das bedeutete, daß noch mehr als 5 γ Eiweiß vorhanden waren).

Nachdem der Äther mit Stickstoff aus der Lösung ausgetrieben worden war, wurde das Heparin mit 0,6 ml der FA-Lösung zur Abtrennung von wasserlöslichen Serumanteilen und zur Konzentrierung gefällt, der Niederschlag 15 Minuten lang bei 4800 U/min. abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig bis auf etwa 0,3 ml abgesaugt. Die Carbazolreaktion konnte hier gleich angeschlossen werden. Zur metachromatischen Bestimmung mußte zuerst das Fällungsmittel ausgetrieben werden, um das Heparin wieder in Lösung zu bringen.

Zur Entfernung des Fällungsmittels wurde der Niederschlag von 200 γ Heparin mit 10 Tropfen Pyridin, 1 Tropfen 0,02 n Natronlauge und 10 Tropfen Wasser im Reagenzglas solange mit einem Stab gerührt, bis er restlos gelöst war. Nach zweimaligem Ausäthern wurden nochmals 2 Tropfen Pyridin und 1 Tropfen Natronlauge nachgesetzt; die Lösung wurde dann solange, mindestens aber 5 mal, ausgeäthert, bis sich der Äther nicht mehr durch das Acridin gelb färbte und die wässrige Phase nicht mehr nach Pyridin roch. Der Äther ließ sich leicht mit Stickstoff austreiben. Ein eventuell hier auftretender Rest von gefälltem (denaturiertem) unlöslichem Eiweiß wurde abzentrifugiert. Für eine anschließende Bestimmung mit der Carbazolmethode wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 4 ml aufgefüllt und 3 mal je 1 ml dieser Lösung in die oben beschriebene Methode eingesetzt. Für die Metachromasie wurde die Lösung auf 2 ml aufgefüllt und je 1 ml derselben in 2 Cuvetten einpipettiert. Die Ergebnisse beider Bestimmungen stimmen weitgehend überein:

reiner Heparinwert	Heparin	
	ohne Serum	mit Serum
100 %	95 %	85 %

Durch die Trennung der Proteine vom Heparin mit Phenol konnten somit 10 % mehr Heparin wiedergefunden werden. Es fehlten aber immer noch 15 %.

d) Der Einsatz von Heparin in die einzelnen Versuchsschritte

Um zu kontrollieren, in welcher Stufe des Versuchs das Heparin verloren ging, setzten wir es nacheinander in die einzelnen Versuchsschritte ein.

In Glas 1 wurde das Heparin vor der Phenolextraktion zum Serum gegeben. In

Glas 2 wurde das Serum mit Phenol behandelt, dann das Heparin hinzugegeben und mit Acridinamin gefällt. In Glas 3 wurde das Heparin erst nach dem Fällen zugegeben.

Glas	1	2	3
Heparin	85 %	87 %	98 %

Dieser Versuch zeigte, daß das meiste Heparin erst beim Fällen und Zentrifugieren des Niederschlags verloren ging. Mehr Fällungsmittel oder die Zugabe von Neutralsalz brachten keine Verbesserung. Auch die Zugabe von Celite, die eine Beschwerung und dadurch ein leichteres Abzentrifugieren des Moleküls bewirken sollte, blieb erfolglos. (Korn (33) konnte durch Celite einen guten Niederschlag des mit Cethyl-trimethyl-ammonium-bromid gefällten Heparins erreichen).

e) Hochtouriges Zentrifugieren

Als sehr günstig erwies sich die Tatsache, daß das zum Serum hinzugefügte gelöste Heparin metachromatisch direkt nachgewiesen werden konnte, während das an Acridinamin gebundene Heparin metachromatisch unwirksam war.

Verschiedene Heparinmengen wurden zusammen mit 1 ml Serum, das vorher schon 15 Minuten lang zentrifugiert worden war, und 2 ml 0,05 m Puffer von pH 5,9 mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Diese Verdünnung erwies sich als notwendig, da das Serum die Messung im Spektralphotometer durch zu starke Trübung gestört hatte. Je 1 ml der 10 ml Lösung wurde in eine Cuvette einpipettiert und der Ausschlag im Spektralphotometer gegen den Vergleichswert abgelesen. So konnten Heparinmengen bis herunter zu 1 γ in der Cuvette quantitativ noch gut nachgewiesen werden.

Die gemessenen Werte ergaben:

Heparin in Gamma	Extinktion
0	0,040
1	0,065
2	0,087
4	0,130
8	0,230
10	0,283
15	0,416
20	0,520

Im Koordinatensystem ergaben diese Werte eine Gerade. Daß der Extinktionswert des Leerwertes für 0 γ Heparin nicht bei 0, also dem Vergleichswert, lag, wurde vermutlich zum Teil durch das Serum bewirkt; dies ist bereits oben näher ausgeführt worden (s. o. Seite 10).

Die Metachromasie zeigt sich jeder pH-Verschiebung gegenüber als empfindlich. Dagegen haben Salzkonzentrationen keinen Einfluß auf die Metachromasie; diese Beobachtung ist auch schon von Jaques gemacht worden (14).

Außer den soeben beschriebenen Versuchen wurden noch andere Versuche gemacht, bei denen die Menge des Heparins konstant gelassen, die des Fällungsmittels dagegen jeweils gesteigert wurde. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Heparin aus dem Überstand und aus dem Niederschlag metachromatisch bestimmt, nachdem das Acridinamin durch Ausäthern aus dem Niederschlag entfernt worden war.

Es wurden folgende Ergebnisse gefunden:

FA-Lösung in ml	Heparinextinktionswert	
	im Überstand	im Niederschlag
0,0	0,375	0,000
0,1	0,292	0,071
0,2	0,112	0,222
0,3	0,045	0,278
0,4	0,000	0,309
0,5	0,000	0,308

Dieser Versuch zeigte, daß sich der Niederschlag in Gegenwart des Serums nicht genügend abzentrifugieren ließ; denn trotz vollständiger Fällung des Heparins konnte dieses im Niederschlag quantitativ nicht mehr gefunden werden.

16 Minuten langes Zentrifugieren in einer hochoberigen Zentrifuge bei 20 000 U/min mit 35 000 g in Bechermittel brachten 100 % der eingesetzten Heparinmenge wieder.

Bei 8 min und 35 000 g = 92 %

Bei 16 " " 20 000 g = 80 %

Bei 16 " " 35 000 g = 100 %

Der Versuchsgang konnte nun wesentlich verkürzt werden. Mit und ohne Phenoleinwirkung ergaben sich gleiche Ergebnisse. Der Fällungsniederschlag des Heparins mit dem Acridinamin ließ sich leicht mit Natronlauge lösen. Das Acridinamin wurde durch Äther entfernt.

4. EINGEHENDE BESCHREIBUNG UND ERGEBNISSE DER HEPARINISOLIERUNG

a) mit dialysiertem Heparin

Das verwendete Mischserum oder Plasma wurde 15 Minuten lang bei 3 000 U/min zentrifugiert, um eventuell vorhandene gröbere Partikel aus ihm zu entfernen. In 6 schwach durchsichtige Polyäthylenzentrifugengläser wurden je 1 ml Serum und 2 ml 0,05 m Puffer vom pH 5,9 einpipettiert, von der Heparinstandardlösung des dialysierten Heparins (siehe oben S. 9) wurden in steigenden Mengen 0 γ; 2,5 γ;

5 γ; 10 γ; 20 γ und 40 γ und 0,6 ml der FA-Lösung hinzugegeben. Nach gutem Durchschütteln der Gläser wurden diese 16 Minuten lang bei 35 000 g zentrifugiert. (Während des Zentrifugierens stieg bei unseren Versuchen die Temperatur von 0 auf 35 Grad an). Der Überstand wurde vorsichtig bis auf ungefähr 0,3 bis 0,4 ml abgesaugt. Nachdem 4 Tropfen 0,2 n Natronlauge zum Niederschlag hinzugegeben worden waren, wurde dieser mit einem Glasstab so lange gerührt, bis er gelöst war. Nun wurde 1 ml destilliertes Wasser zugegeben und mindestens 3 mal mit Äther bis zur Entfärbung ausgeschüttelt. Der gelöste Äther ließ sich leicht mit Stickstoff austreiben. Mit Hilfe einer kalibrierten Saugpipette wurde die Lösung auf genau 2 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt, je 1 ml in 2 Cuvetten einpipettiert und metachromatisch bestimmt.

Manchmal zeigte sich nach der Zugabe des Azurs, je nach Art des verwendeten Serums, eine leichte Trübung in der Cuvette. Durch 15 Minuten langes Zentrifugieren bei 3 000 U/min ließ sich die Trübung leicht beseitigen.

Ergebnisse: (Abbildung 1)

Der Vergleichswert wurde gegen Wasser auf eine Extinktion von 0,400 eingestellt.

Eingesetzte Heparinmenge in Gamma	Eichwert		Wiedergefundenes Heparin		
	Ext.	Δ Ext.	Ext.	Δ Ext.	%
0	0,025	0,000	0,061	0,000	94
0	0,031		0,062		
2,5	0,058	0,032	0,095	0,030	
2,5	0,063		0,088		
5	0,093	0,062	0,128	0,060	97
5	0,088		0,135		
10	0,144	0,113	0,175	0,111	98
10	0,139		0,170		
20	0,272	0,238	0,282	0,225	94
20	0,260		0,292		
40	0,495	0,462	0,525	0,460	100
40	0,485		0,519		

(Δ Ext. = Extinktion nach Abzug des Nullwertes).

b) mit Liquemin

In der Praxis wird zur Heparintherapie das Präparat "Liquemin" (Hoffmann-La Roche) mit 5000 I. E. /ml viel verwendet.

Für uns war es interessant, zu untersuchen, ob mit diesem Präparat dieselben

Ergebnisse erzielt werden können wie mit dem dialysierten Heparin.

Unter sonst gleichen Bedingungen konnten wir bis zu oberen Werten von 10 γ /ml gleiche Ergebnisse finden. Bei mehr als 10 γ /ml flachte sich die Heparin-Liqueminkurve gegenüber der Eichkurve leicht ab (Abbildung 2). Bei größeren Heparinmengen wurde eine größere Menge des Fällungsmittels gebraucht. Für etwa 20 - 25 γ Heparin wurden 0,8 ml der Fällungsmittellösung gebraucht. Bei unseren Versuchen konnte die Fällungsmittelmenge von 0,8 ml auf 1 ml Serum nicht überschritten werden, da sonst durch Eiweißmitfällung die Reaktion gestört worden wäre.

Ergebnisse: (Abbildung 2)

Eingesetzte Liqueminmenge in Gamma	Eichwert		Wiedergefundene Liqueminmenge			
			0,6 ml FA		0,8 ml FA	
			Ext.	Δ Ext.	Ext.	Δ Ext.
0	0,014	0,000	0,025	0,000	0,035	0,000
0	0,009		0,030		0,029	
2,5	0,046	0,032	0,060	0,035	0,078	0,047
2,5	0,041		0,064		0,080	
5	0,080	0,071	0,098	0,071	0,118	0,084
5	0,085		0,099		0,115	
10	0,168	0,148	0,162	0,134	0,182	0,167
10	0,150		0,160		0,215	
20	0,298	0,297	0,234	0,204	0,310	0,283
20	0,319		0,228		0,320	
25	0,356	0,349	0,250	0,233	0,340	0,309
25	0,365		0,270		0,342	

In unseren Versuchen schwankten die Werte der wiedergefundene Heparinmenge zwischen 94 % und 100 %. Ursache der unterschiedlichen Werte war vermutlich die Schwankungsbreite der metachromatischen Bestimmungsmethode und nicht die ungenügende Heparingewinnung. Zur genaueren Bestimmung müssen daher andere Bestimmungsmethoden angewandt werden (s. o. Seite 9). Auf die Abweichungen der Leerwerte vom Vergleichswert ist bereits an anderer Stelle näher eingegangen worden (S. 9).

Bei der Liqueminbestimmung konnten hier nur Heparinmengen bis höchstens 20 γ /ml Serum bestimmt werden, da die Fällungsmittelmenge von 0,8 ml nicht überschritten werden durfte. Im allgemeinen steigt bei therapeutischen Liquemingaben der Heparinspiegel im Blut nicht über 20 γ /ml Serum, so daß diese Bestimmung vollkommen ausreichend wäre.

VI. VORVERSUCHE ZUR ANWENDUNG DER METHODE

1. HEPARIN IM CITRATBLUT

Während zu Serum hinzugefügtes Heparin quantitativ wiedergefunden werden konnte, fand sich zu frischem Citratblut hinzugefügtes Heparin nach 2 Stunden nur noch zu etwa 50 % wieder:

Zu 5 ml Citratblut wurden 60 γ dialysiertes Heparin gegeben. Das Blut wurde 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann zentrifugiert und das Heparin im Plasma metachromatisch bestimmt.

Bei vollständiger Wiedergewinnung des Heparins müßten in 1 ml Plasma, bei einem Hämatokrit von 44,0, 21,5 γ Heparin gefunden werden können. Tatsächlich konnten aber nur 11 γ und 11,5 γ Heparin/ml Plasma wiedergefunden werden. Diese Ergebnisse bedürfen allerdings noch einer genaueren Untersuchung; denn da bei diesem Versuch die Erythrocyten nicht ausgewaschen wurden, kann an diesen leicht haftendes Heparin verloren gegangen sein. Nach Untersuchungen von Jaques und Charles (21) bleiben selbst nach wiederholtem Auswaschen 5 % - 10 % des Heparins an den Erythrocyten adsorbiert. Durch genauere Untersuchungen müßten noch die Zeitabhängigkeit und die Wirkung bei verschiedenen Heparinmengen kontrolliert werden. Wahrscheinlich liegt hier nicht nur eine Adsorption des Heparins durch die Erythrocyten vor, da 2 Stunden nach der Heparinzugabe zum Blut ein Teil der Erythrocyten hämolysiert.

Nach Versuchen von Roth und Frumin (37) mit Erythrocytensuspensionen sollen 50 % des Heparins nur in den ersten 15 Minuten zerstört werden. Dieser Wert liegt aber sicher zu hoch.

2. DIE BESTIMMUNG DES HEPARINBLUTSPIEGELS NACH INJEKTION VON LIQUEMIN

Ein Patient bekam im Abstand von 14 Tagen 2 mal eine therapeutische Dosis von je 3 ml Liquemin (= 15 000 I. E.) intravenös injiziert.

Bei einem Gesamtblutvolumen von 4 990 ml und einem Plasmavolumen von 3 000 ml, bestimmt durch Evans-Blau-Verdünnung würden damit auf 1 ml Plasma 5 I. E. = 38,5 γ /ml Plasma kommen (sofern man für 1 mg Heparin eine Aktivität 130 I. E. annimmt, wobei 1 I. E. = 7,7 γ Heparin entspricht).

In den unten angegebenen Zeitabständen wurden dem Patienten je 5 ml Blut entnommen. Um eine Verdünnung des Blutes zu vermeiden, wurde dieses nach der Entnahme in Reagenzgläser gebracht, in denen vorher 0,05 ml einer 30 %igen Kalium-Oxalat-Lösung eingetrocknet worden waren. Dann wurde sofort 20 Minuten lang bei 3 000 U/min zentrifugiert, um die Erythrocyten möglichst

schnell vom Plasma zu trennen. Das abgesaugte Plasma wurde in die oben beschriebene Methode zur Isolierung des Heparins eingesetzt.

Ergebnisse: (Abbildung 3)

Zeit nach der Liquemininjektion	1. Versuch 0,6 ml FA Ext. γ /ml		2. Versuch 0,8 ml FA Ext. γ /ml	
0 min	0	0	0	0
1 "	288	30		
2 "			174	12
5 "	217		165	

Zeit nach der Liquemininjektion	1. Versuch 0,6 ml FA Ext. γ /ml		2. Versuch 0,8 ml FA Ext. γ /ml	
15 min	193			
20 "			101	7
30 "	175			
60 "	95	6	62	4
2 Stunden	66	4	33	2
4 "	50		25	
6 "			17	
7 "	5-0			
8 "			5-0	

Vier und sechs Stunden nach der Injektion ließ sich Heparin im Blut nachweisen, während nach 8 Stunden das Vorhandensein von Heparin im Blut nicht mehr mit Sicherheit festgestellt werden konnte.

Die gefundenen Werte stimmten weitgehend mit den gleichzeitig bestimmten Gerinnungszeiten überein.

Gerinnungszeit zum 1. Versuch:

Stunden nach erfolgter Injektion	Gerinnungszeit
1	> 25 min
4	19 min 5 sec
6	5 min 30 sec
normale Gerinnungszeit:	5 min 0 sec

Von der zu erwartenden Ausgangsmenge des Heparins von 38,5 γ /ml Plasma konnten im 1. Versuch noch etwa 30 γ /ml, im 2. Versuch aber nur 12 γ /ml nachgewiesen werden. Zwar war die 1. Blutentnahme im 2. Versuch etwas später vorgenommen worden, doch zeigten auch die weiteren Entnahmen, welche beim 1. und

2. Versuch in gleichen Zeitabständen nach der Injektion vorgenommen worden waren, beim 1. Versuch wesentlich höhere Werte. Dies kann möglicherweise von einer Anpassung des Körpers an das Heparin herrühren, da der Versuch am selben Patienten vorgenommen wurde. Aufgrund des langsameren Auslaufens der Kurve des 2. im Vergleich zu der des 1. Versuchs besteht aber auch die Möglichkeit, daß bei der Injektion des Heparins nicht alles Heparin in die Vene, sondern versehentlich paravenös gespritzt wurde mit der Folge, daß dadurch ein Teil des Heparins erst später in die Blutbahn gelangt ist.

VII. DISKUSSION

Mit der hier beschriebenen Methode bietet sich die Möglichkeit, verschiedene Fragen auf dem Gebiet der Heparinforschung genauer zu prüfen und aufzuklären.

1. DAS VERHALTEN DES HEPARINS IM BLUT

Wie oben (S. 21) schon kurz erwähnt worden ist, scheint das zum Blut hinzugefügte Heparin durch die Erythrocyten zerstört oder adsorbiert zu werden. Auch scheinen die Erythrocyten selbst durch Heparin zerstört zu werden, da sie in Gegenwart von Heparin zur Hämolyse neigen. Diese Möglichkeit der experimentellen Aufklärung konnte hier nur angedeutet werden und bedarf noch ausführlicher Untersuchungen.

2. ENDOGENES HEPARIN

Viele Forscher haben sich bereits mit der Frage beschäftigt, ob im Blut endogenes Heparin enthalten ist. Die Ergebnisse sind sehr unterschiedlich. Im Jahre 1949 wiesen Jaques et al (14) durch Fällung mit Octylamin und anschließender Bestimmung der Blutgerinnungszeit 0,1 γ Heparin/ml Plasma als normale Blutkonzentration nach. Später korrigierte Jaques (15) sein Urteil dahingehend, daß im normalen Plasma kein freies Heparin nachzuweisen sei, es sei denn, daß es in kleineren Mengen als 0,1 γ /ml oder in gebundener Form vorliege, so daß es durch die Phenolmethode nicht erfaßt werden kann.

Nach Nilsson und Wenckert (37) sollen sogar durch Fällung mit Octylamin 0,01 mg/ml eines dem Heparin chemisch gleichen oder sehr ähnlichen gerinnungshemmenden Stoffes aus menschlichem Citratplasma isoliert worden sein.

Engelberg (38) gibt überschlagsweise 10-20 I. E. pro 100 ml im Plasma (etwa 0,8-1,5 γ /ml) an. Damit würden sich normalerweise 3-6 mg Heparin in 3 l Plasma befinden.

Vielleicht bietet sich mit der von uns entwickelten Methode eine Möglich

keit, diese Frage zu klären. Es konnte gezeigt werden, daß zum Serum hinzugefügtes Heparin voll wiederauffindbar und nicht so fest an Serumbestandteile gebunden war, daß es für diese Bestimmungsmethode nicht zugänglich war.

Für verschiedene Seren zeigten sich unterschiedliche Extinktionswerte (s. o. S. 10), vielleicht ist dies ein Hinweis auf das Vorhandensein von endogenem Heparin im Blut. Allerdings ließ sich mit der Ribonucleasehemmung aus 1 ml Serum kein Heparin nachweisen. Vielleicht können sehr kleine endogene Heparinmengen durch Summierung mehrerer Niederschläge nach der oben beschriebenen Isolierungsmethode oder durch die direkte Fällung des Heparins aus mehreren ml Serum bei längerem oder höhertourigerem Zentrifugieren gefunden werden. Die Bestimmung darf dann nicht metachromatisch erfolgen, sondern z. B. durch die Antithrombinmethode nach Jaques und Charles oder durch die Ribonucleasehemmung nach Hoborn (siehe S. 9). Die Aktivität des Heparins ging bei Fällung mit Acridinamin nicht oder nur kaum verloren. Durch die Bestimmungsmethode von Hoborn konnten von 10 γ Ausgangsheparin mit einer Aktivität von 125 I. E. /mg noch 120 I. E. /mg wiedergefunden werden, ein Wert, der innerhalb der Toleranzgrenze liegt. Metachromatisch wurden 10 γ Heparin quantitativ wiedergefunden.

Zu bemerken ist noch, daß sich Thrombocid, das auch zur Therapie verwendet wird, mit Acridinamin quantitativ fällen läßt und bei einer Wellenlänge von 515 m μ mit Azur metachromatisch wirksam ist. Die Extinktionswerte für 20 γ Thrombocid liegen etwa gleich hoch wie die für 35 γ Heparin.

3 DER HEPARINSPIEGEL IM BLUT UND URIN NACH HEPARININJEKTION

Jaques et al (14) konnten nach einer intravenösen, einem 22,5 kg schweren Hund verabreichten Injektion von 45 mg Heparin mit der Blutgerinnungsmethode nur 3 Stunden lang Heparin im Serum nachweisen.

Wilander (39 und 40) konnte an Ratten noch nach 48 Stunden geringe Heparinmengen im Harn nachweisen (1 und 16).

Mit unseren Versuchen konnte bei einer Heparininjektion von 3 ml Liquemin noch nach 4-6 Stunden mit Sicherheit Heparin im Blut nachgewiesen werden. Wie lange Heparin auch in Abhängigkeit von der injizierten Menge im Blut nachgewiesen werden kann, muß noch genauer geprüft werden. Zusätzlich kann auch die Ausscheidung im Harn kontrolliert werden. Doch benötigt man zur metachromatischen Bestimmung des Heparins im Harn eine besondere Eichkurve, da im Urin andere pH-Verhältnisse vorliegen. Die nach Neubauer (41) im Harn zu 5-10 mg/100 ml vorliegende Chondroitinschwefelsäure wurde durch Acridinamin mitgefällt, zeigte aber keine metachromatische Wirksamkeit.

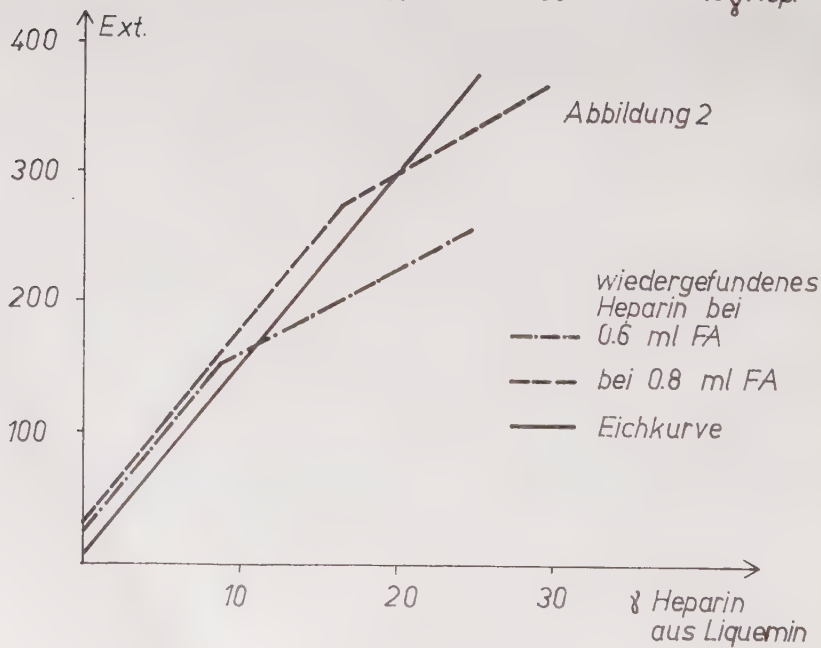
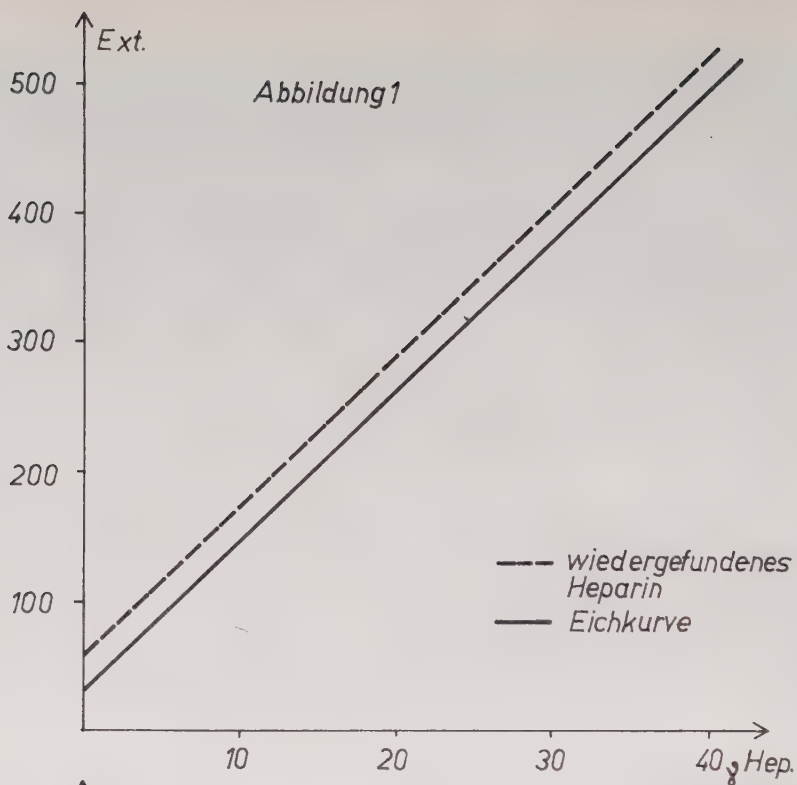
4. VORSCHLAG ZUR BESSEREN FÄLLUNG VON LIQUEMIN IN HÖHERER KONZENTRATION

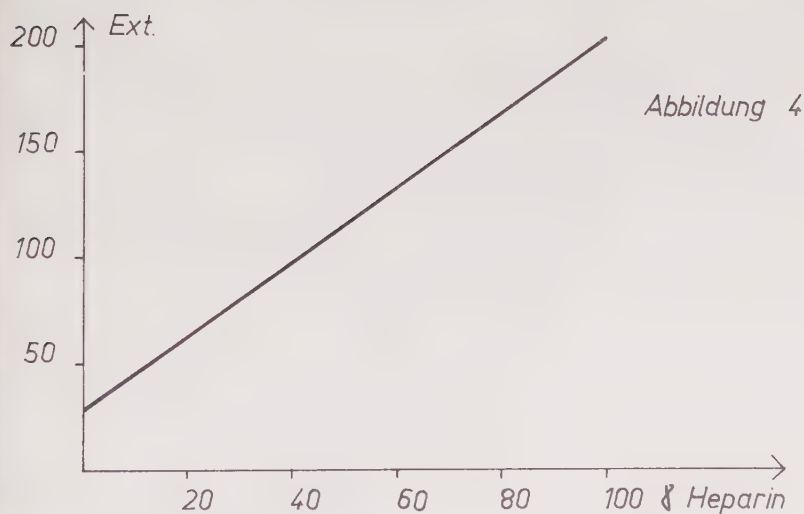
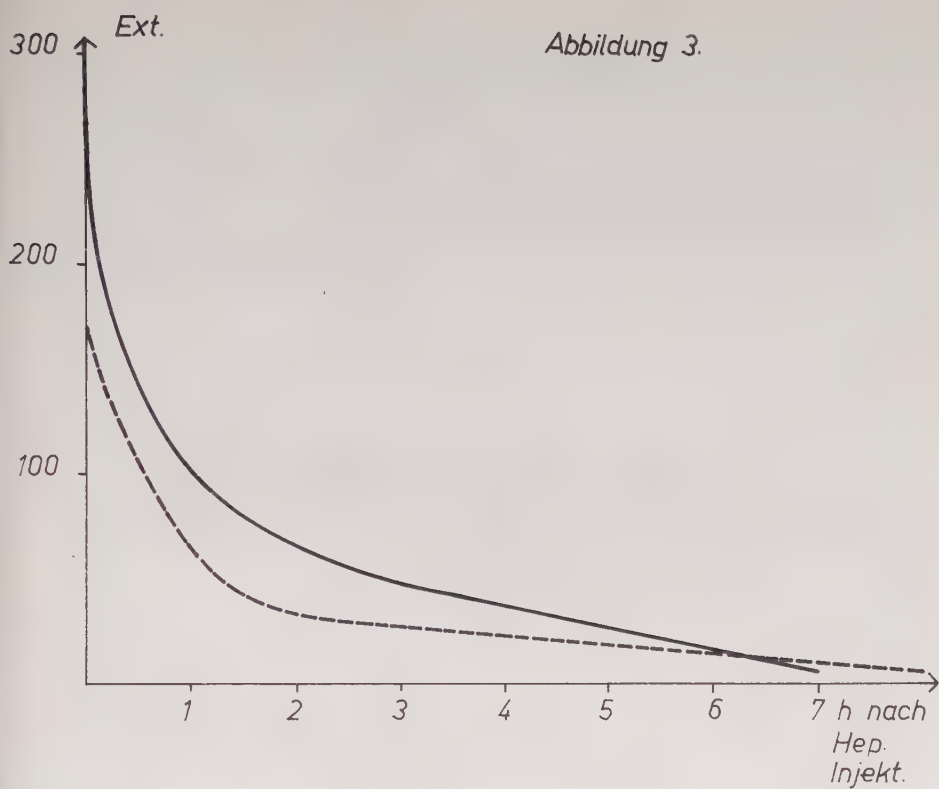
Durch Reinigung des Liquemins von niedermolekularen Bruchstücken kann die Bestimmungsmethode wahrscheinlich noch verbessert werden. Unter Umständen läßt sich auch in der Reihe der Acridinamine ein besseres Fällungsmittel finden, welches erst bei sehr viel höherer Konzentration Eiweiß mitfällt.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird hier eine Methode beschrieben, durch die Heparin in wässrigen, biologischen Systemen, insbesondere im Serum, isoliert werden kann; dadurch soll eine direkte quantitative Bestimmung des Heparins erzielt werden. Im einzelnen werden die Bedingungen untersucht, die eine quantitativ isolierende Fällung in einem Reaktionsschritt mit Hilfe von Acridinamin und hochtourigem Zentrifugieren ermöglichen. Ein anschließendes verbessertes absorptionscolorimetrisches Verfahren - Metachromasie von Azur A - gestattet die sichere Bestimmung von 2 γ Heparin pro ml Serum.

Die Methode ist einfach und schnell. Zwei Stunden nach der Entnahme von 5 ml Blut kann die Heparinkonzentration des Serums bestimmt sein. So bietet diese Methode eine Möglichkeit, bei der Heparintherapie direkt den Heparinspiegel im Blut auf chemischem Wege zu kontrollieren.





Herrn Professor Dr. Nepomuk ZÖLLNER danke ich für
die Überlassung des Themas, für die väterliche Unter-
stützung bei der Ausführung der Arbeit und für die Be-
urteilung ihrer Niederschrift.

X. SCHRIFTTUM

1. I. E. Jorpes: Heparin in the Threatment of Thrombosis. Oxford, Med. Publ. Oxford Univ. Press, London 1946.
2. R. Marbet und A. Winterstein: Experientia 8, 1952.
3. R. Marbet und A. Winterstein: Experientia 10, 1954.
4. A. Winterstein und A. Struder: Helvet. physiol. pharm. acta 9, 1951.
5. H. Gibian: Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen. Einzeldarstellungen aus dem Ges. Gebiet der Biochem. 4, Wien, 1959.
6. N. Zöllner, E. Rothmund und W. Seitz: Klin. Wschr. 32, 1954.
7. E. Donzelot und H. Kaufmann: Presse med. Paris' 1949.
8. O. Snellmann: J. Biol. Chem. 174, 1948.
9. zitiert nach 11.
11. A. Winterstein: Pharmaceut. wbl. 92, Amsterdam, 1957.
12. L. B. Jaques, H. I. Bell und M. H. Cho: Proc 1, Intern. Cong. on Thromb. a. Embolism. Schwabe a. Co. Basel, 1954.
13. J. D. H. Homan und J. Lens: Biochim. biophysica acta 2, 1948.
14. L. B. Jaques, F. C. Monkhouse und M. Stewart: J. Physiol. 109, 1948.
15. F. C. Monkhouse und L. B. Jaques: J. Laborat. Clin. Med. 36, 1950.
16. R. Marbet und A. Winterstein: Helvet. physiol. pharm. acta 9, 1951.
17. A. F. Charles und D. A. Scott: J. Biol. Chem. 102, 1933.

18. L.B. Jaques und G.T. Warters:
J. Physiol 99, 1941.
19. C.H. Best und D.E. Green:
Curr. in Biochem. Res. 1946
20. F.C. McIntosh: Biochem. J. 35, 1941.
21. L.B. Jaques und A.F. Charles:
J. Pharmacy. Pharmacol. 14, 1941.
22. L.B. Jaques, M. Bruce Mitford und A.G. Rickert:
Phys. Biochem. Pharm. Excerpta Med. 1, 1948.
23. R.B. Gibson, T.L. Carr, S. Green und W.M. Fowler:
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 79, 1952.
24. Z. Dische: Meth. biochem. Analyses 2, 1955.
25. N. Zöllner und J. Fellig:
Amer. J. Physiol. 173, 1953.
26. G. Hobom: Dissertation, München 1961.
27. H.G. Bungenberg de Jong:
Protoplasma 32, Springer-Verlag Wien, 1939.
28. J. Fellig: Res. Departm. Union Carbide Chem. Co.
S.-Charleston, W-Virginia, 1959/60.
29. B. Lorenz, R. Lorenz und N. Zöllner:
Zschr. Naturforsch. 15b, 1960.
30. H. Engelberg, A. Dudley und L. Freemann:
J. Laborat. Clin. Med. 46, 1955.
31. H. Rein und M. Schneider:
Physiol. des Menschen, 12. Auflage, Springer-Verlag
Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955.
32. R. Blasius und W. Seitz:
Klin. Wschrft 37/38, 1952.
33. E.D. Korn: J. Biol. Chem. 234, 1959.
34. M.L. Wolfrom, R. Montgomery, J.V. Krabinos und P. Rathgeber:
J. Amer. Chem. Soc. 72, 1950.
35. M.L. Wolfrom: J. Amer. Chem. Soc. 234, 1959.
36. G. Schramm: Zschr. Naturforsch. 11b, 1956.

37. J. M. Nilsson und A. Wenckert:
Acta med. Scand. 150, Supp. 297, 1954.
38. H. Engelberg:
Amer. J. Clin. Nutr. 8, 1960.
39. O. Wilander:
Scand. Arch. Physiol. 81, Supp. 15, 1958.
40. O. Wilander:
Acta med. Scand. 94, 1938.

LEBENS LAUF

Ich, Christiane Burger, wurde am 7.1.1937 in Marburg/Lahn geboren als Tochter des Dr. med. Herbert Burger und seiner Ehefrau Leni, geb. Schult. Ich habe eine Schwester im Alter von 26, und drei Brüder im Alter von 23, 22 und 19 Jahren.

Im Herbst 1937 ließ sich mein Vater in Ulm/Donau als Facharzt für Hals-Nasen- und Ohrenleiden nieder. Dort besuchte ich von 1943 bis 1947 die Volksschule und anschließend das Mädchengymnasium, wo ich am 29. Februar 1956 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1956 immatrikulierte ich mich an der Universität in Tübingen für das Studium der Medizin. Das dritte vorklinische Semester absolvierte ich an der Universität in Hamburg, um dann wieder nach Tübingen zurückzukehren. Dort bestand ich dann am 26. Juli 1958 die ärztliche Vorprüfung mit der Gesamtnote "sehr gut".

Mein erstes klinisches Semester verbrachte ich an der Universität in München, das zweite an der Universität in Wien. Seit dem dritten klinischen Semester studierte ich wieder in München. Dort arbeitete ich von November 1959 bis Mai 1960 im Staub-Lungen-Labor der medizinischen Universitätspoliklinik an meiner Dissertation. Am 20. Dezember 1961 beendete ich die ärztliche Staatsprüfung mit der Gesamtnote "sehr gut".

